

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003799

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-285542
Filing date: 29 September 2004 (29.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

2 0 0 4 年 9 月 2 9 日

出 願 番 号
Application Number:

特 願 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 2

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

J P 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 2

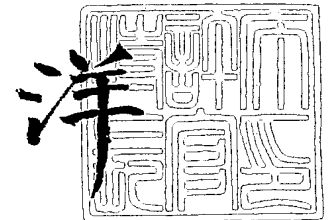
出 願 人
Applicant(s):

プリマハム株式会社

2 0 0 5 年 4 月 1 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004P2325
【提出日】 平成16年 9月29日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/53
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 秋元 政信
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 金井 聡
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 加藤 重城
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内
 【氏名】 浪岡 真
【特許出願人】
 【識別番号】 000113067
 【氏名又は名称】 プリマハム株式会社
 【代表者】 貴納 順二
【代理人】
 【識別番号】 100107984
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 廣田 雅紀
 【電話番号】 03-5575-6500
 【連絡先】 担当
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102255
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小澤 誠次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100123168
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120086
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 044347
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 9701840

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

未変性 α s 1 カゼイン及び尿素処理 α s 1 カゼインを認識する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体を用いることを特徴とする乳アレルギーの検出方法。

【請求項 2】

未変性 α s 1 カゼイン及び尿素処理 α s 1 カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する 2 種類の抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体を併用することを特徴とする乳アレルギーの検出方法。

【請求項 3】

サンドイッチ E L I S A により、未変性 α s 1 カゼイン及び尿素処理 α s 1 カゼインを、10～1000 p p b の濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 4】

抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体が、未変性 α s 1 カゼイン、尿素処理 α s 1 カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 5】

抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体が、配列番号 1 で示される α s 1 カゼインのアミノ酸配列の 132 番目から 193 番目までの領域を認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 6】

抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体が、ハイブリドーマ (FERM AP-20206) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体 P a s 1 C N 1 及び／又はハイブリドーマ (FERM AP-20207) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体 P a s 1 C N 2 であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 7】

検体から、尿素と 2-メルカプトエタノールを用いてカゼインを抽出することを特徴とする請求項 1～6 のいずれか記載の乳アレルギーの検出方法。

【請求項 8】

未変性 α s 1 カゼイン及び尿素処理 α s 1 カゼインを認識する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体を備えたことを特徴とする乳アレルギー検出用キット。

【請求項 9】

未変性 α s 1 カゼイン及び尿素処理 α s 1 カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する 2 種類の抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体を備えたことを特徴とする乳アレルギー検出用キット。

【請求項 10】

異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクロナール抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 9 記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 11】

抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体が、未変性 α s 1 カゼイン、尿素処理 α s 1 カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体であることを特徴とする請求項 8～10 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 12】

抗 α s 1 カゼインモノクロナール抗体が、配列番号 1 で示される α s 1 カゼインのアミノ酸配列の 132 番目から 193 番目までの領域を認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 1 3】

抗 α s 1 カゼインモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ (FERM AP-20206) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 1 及び／又はハイブリドーマ (FERM AP-20207) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 2 であることを特徴とする請求項 8 ～ 1 2 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 1 4】

検体からのカゼイン抽出剤としての、尿素と 2-メルカプトエタノールが備えられていることを特徴とする請求項 8 ～ 1 3 のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット。

【請求項 1 5】

ハイブリドーマ (FERM AP-20206) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 1。

【請求項 1 6】

ハイブリドーマ (FERM AP-20207) が産生する抗 α s 1 カゼインモノクローナル抗体 P a s 1 C N 2。

【書類名】明細書

【発明の名称】乳アレルギーの検出方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、食品等の試料中に含まれる未変性又は変性の乳アレルギーを定性的かつ定量的に高感度で分析することができる、 α s1カゼインの主要タンパク質である α s1 α s1カゼインを指標とした乳アレルギーの検出方法や、それに用いられる乳アレルギーの検出用キットに関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

自然環境の減少、車や工場などからの排気ガス、住宅事情等、或いは食べ物の変化など様々な因子により、現在では、3人に1人が何らかのアレルギー疾患をもつといわれている。特に、食物アレルギーは、食品中に含まれるアレルギー誘発物質（以下、食物アレルギーという）の摂取が引き起こす有害な免疫反応であり、皮膚炎、喘息、消化管障害、アナフィラキシーショック等を引き起こし、このような食物アレルギーの患者が増加していることから、医学上及び食品産業上、深刻な問題を生じている。これらの危害は死に至らせることがあり、未然に処置を施す必要がある。そのためには、表示を通じて消費者へ情報提供の必要性も高まっており、FAO/WHO合同食品規格委員会は、アレルギー物質として知られている8種の原材料を含む食品にあっては、それを含む旨の表示について合意し、加盟国で各国の制度に適した表示方法を検討することとした（1999年6月）。日本では過去の健康危害などの程度、頻度を考慮して重篤なアレルギー症状を起した実績のある24品目の食品について、その表示方法が定められた（2002年4月より施行）。アレルギーを引き起こす食品としては、卵類、牛乳類、肉類、魚類、甲殻類及び軟体動物類、穀類、豆類及びナッツ類、果実類、野菜類、ビール酵母若しくはゼラチンなどが知られており、特に乳アレルギーの主要成分として α s1カゼインが知られている。

【0 0 0 3】

従来、アレルギーの検出する方法としては、例えば、アレルギーに特異的に反応するイムノグロブリンを定量する方法（特許文献1参照）や、抗原抗体複合体を含有する検体中の該抗原抗体複合体を酸処理等により解離させ、必要に応じてアルカリを用いて中和処理を行った後、該検体中のアレルギー特異的IgE抗体を測定する方法（特許文献2参照）等が知られている。

【0 0 0 4】

また、現在、現在、乳、卵、小麦、そば、落花生の特定原材料を検出するための公定法として、加熱・非加熱複合抗原より得られるポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（特許文献3参照；以下「市販公定法A」という）、あるいは精製抗原より得られたポリクローナル抗体を用いた免疫学的な検出方法（以下「市販公定法B」という）が用いられている。これらは、特異的にアレルギーを検出するために有効な方法であるが問題も多い。例えば、市販公定法Aでは複合抗原を用いているため、何に対する抗体なのかが不明で、交差性が高く、また非特異反応が増える可能性がある。また、市販公定法Bでは、抗原が精製されているため抗体の特異性は明確であるものの、未変性の抗原を用いて作製された抗体を使用しているため、変性／未変性により抗体が結合する程度に違いがあるため、同じ添加量であっても、加熱前、加熱後での定量値が異なるという問題があった。

【0 0 0 5】

【特許文献1】特開平05-249111号公報

【特許文献2】特開平07-140144号公報

【特許文献3】特開2003-155297号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 6】

本発明の課題は、乳アレルギーを含む食品において、乳アレルギーが変性／未変性のい

かなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キット等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、特定原材料の一つである乳の検出方法の検討を行うに当たり、カゼインの主要たんぱく質である α s1カゼインを指標として、これに対するモノクローナル抗体（以下MAbと記す場合がある）を作出し、その中から未変性 α s1カゼイン、尿素処理 α s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識することができるMAbを複数選択し、サンドイッチELISAにより、未変性 α s1カゼイン、尿素処理 α s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを、100～1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうるMAbの組合わせを見い出した。また、これらのMAbを用いると、食品中の乳アレルゲンがいかなる加工工程を経た場合にでも、本発明による検出方法や検出キットを利用する者がより簡便に検査対象製品からの乳アレルゲンを検出しうることを確認した。以上の知見に基づいて本発明は完成するに至ったものである。

【0008】

すなわち本発明は、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体を用いることを特徴とする乳アレルゲンの検出方法（請求項1）や、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗 α s1カゼインモノクローナル抗体を併用することを特徴とする乳アレルゲンの検出方法（請求項2）や、サンドイッチELISAにより、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを、10～1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうることを特徴とする請求項1又は2記載の乳アレルゲンの検出方法（請求項3）や、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、未変性 α s1カゼイン、尿素処理 α s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の乳アレルゲンの検出方法（請求項4）や、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、配列番号1で示される α s1カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域を認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の乳アレルゲンの検出方法（請求項5）や、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ（FERM AP-20206）が産生する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN1及び／又はハイブリドーマ（FERM AP-20207）が産生する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN2であることを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の乳アレルゲンの検出方法（請求項6）や、検体から、尿素と2-メルカプトエタノールを用いてカゼインを抽出することを特徴とする請求項1～6のいずれか記載の乳アレルゲンの検出方法（請求項7）に関する。

【0009】

また本発明は、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする乳アレルゲン検出用キット（請求項8）や、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗 α s1カゼインモノクローナル抗体を備えたことを特徴とする乳アレルゲン検出用キット（請求項9）や、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つが、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項9記載の乳アレルゲン検出用キット（請求項10）や、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、未変性 α s1カゼイン、尿素処理 α s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 α s1カゼインモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項8～10のいずれか記載の乳アレルゲン検出用キット（請求項11）や、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、配列番号1で示される α s1カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域を認識するモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項8～11

のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット（請求項12）や、抗 α s1カゼインモノクロナール抗体が、ハイブリドーマ（FERM AP-20206）が産生する抗 α s1カゼインモノクロナール抗体Pas1CN1及び／又はハイブリドーマ（FERM AP-20207）が産生する抗 α s1カゼインモノクロナール抗体Pas1CN2であることを特徴とする請求項8～12のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット（請求項13）や、検体からのカゼイン抽出剤としての、尿素と2-メルカプトエタノールが備えられていることを特徴とする請求項8～13のいずれか記載の乳アレルギー検出用キット（請求項14）に関する。

【0010】

さらに本発明は、ハイブリドーマ（FERM AP-20206）が産生する抗 α s1カゼインモノクロナール抗体Pas1CN1（請求項15）や、ハイブリドーマ（FERM AP-20207）が産生する抗 α s1カゼインモノクロナール抗体Pas1CN2（請求項16）に関する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によると、食品等に含まれる乳アレルギー（抗原）についての免疫学的な検出方法において、乳アレルギーが、変性／未変性のいかなる状態にあっても正確に定性かつ定量的に検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明の乳アレルギーの検出方法としては、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを用いる乳アレルギーの免疫学的な検出方法や、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗 α s1カゼインMAbを併用する乳アレルギーの免疫学的な検出方法であれば特に制限されず、また、本発明の乳アレルギー検出用キットとしては、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識する抗 α s1カゼインMAbを備えた免疫学的なアレルギー検出用キットや、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗 α s1カゼインMAbを備えた免疫学的なアレルギー検出用キットであれば特に制限されないが、上記抗 α s1カゼインMAbとしては、未変性 α s1カゼイン及び尿素処理 α s1カゼインに加えて、未変性カゼインナトリウム及び変性カゼインナトリウムを認識する抗 α s1カゼインモノクロナール抗体が好ましく、ここで「乳アレルギー」とは、乳カゼインの主要タンパク質である α s1カゼインを含むものをいう。上記免疫学的な乳アレルギーの検出方法は、未変性／変性の乳カゼインを含む試料を、標識化した抗 α s1カゼインMAbと接触させ、あるいは標識化した抗体の存在下に抗 α s1カゼインMAbと接触させ、抗原抗体反応により標識化免疫複合体として捕捉する免疫反応段階と、生成した該免疫複合体をその分子中に存在する標識物質を用いて分離・測定する検出段階とからなり、かかる免疫反応段階における抗原抗体反応の方法も特に制限されず、例えば、以下の方法を例示することができる。

【0013】

不溶性担体に結合した抗 α s1カゼインMAbに試料中の乳カゼインを捕捉させた後に標識化抗IgG抗体を反応させるサンドイッチ法や、不溶性担体に結合した抗 α s1カゼインMAbと異なるエピトープを認識する標識化抗 α s1カゼインMAb（第二抗体）を用いるサンドイッチ二抗体法や、不溶性担体に結合した抗 α s1カゼインMAbに試料中の乳カゼインを標識化抗原の存在下で反応させる競合法や、乳カゼインを含有する試料にこれらと特異的に反応する磁気ビーズ結合標識抗 α s1カゼインMAbを作用させさせた後、磁力により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する磁気ビーズ法や、乳アレルギーを含有する試料にこれらと特異的に反応する標識抗 α s1カゼインMAbを作用させて凝集沈殿させた後、遠心分離により分離した免疫複合体中の標識物質を検出する凝集沈殿法や、金コロイド等で標識された抗 α s1カゼインMAbと乳アレルギーであるカゼインが結合した抗原抗体複合体が試験ストリップ上を毛管現象等により移動する途中に、乳

アレルギーと結合する抗 α s1カゼインMAbをあらかじめ固定しておき、抗原抗体複合体を補足させることで現れる着色ラインの有無によって定性分析するイムノクロマト法の他、二重免疫拡散法、放射免疫拡散法など公知の免疫測定法を利用することができるが、抗 α s1カゼインMAbとして、それぞれ異なるエピトープを認識する2以上のモノクローナル抗体を用いる方法、例えば、食品中の未変性 α s1カゼイン及び／又は変性 α s1カゼインが100～1000ppbの濃度範囲においても定性的かつ定量的に分析しうる高感度の点でサンドイッチ二抗体法が、定性的には簡便性からイムノクロマト法が好ましい。また、食肉製品等の食品試料中からカゼインの抽出する場合、尿素と2-メルカプトエタノールを用いることが望ましい。

【0014】

上記抗原抗体反応において用いられる不溶性担体としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物、その他、ガラス、金属、磁性粒子及びこれらの組み合わせ等を挙げることができ、また、不溶性担体の形状としては、例えば、トレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管、ラテックスビーズ状等の種々の形状で用いることができる。更に、これら不溶性担体への抗原又は抗体の固定化方法は特に限定されるものでなく、物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法等を用いることができる。

【0015】

本発明の乳アレルギーの検出方法や乳アレルギー検出用キットに用いられる抗 α s1カゼインMAbの免疫グロブリンのクラス及びタイプは特に制限されないが、抗 α s1カゼインMAbや抗 α s1カゼインMAbとして、IgGクラス、タイプ κ の抗体が好適に用いられる。また、モノクローナル抗体の形態としては、全抗体又はF(ab')₂、Fab等の断片を用いることもできる。抗体の由来は特に限定されるものではないが、マウス、ラット、ヒト、兎、鶏等を挙げることができるが、作製の簡便性からマウスに由来するモノクローナル抗体が好適に用いられる。また、抗 α s1カゼインMAbは、未変性又は変性の α s1カゼインで免疫した動物から採取した抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により調製されるハイブリドーマを培地上で培養するか、又は動物腹腔内に投与して腹水内で増殖させた後、該培養物又は腹水から採取することにより製造することができる。

【0016】

抗 α s1カゼインMAb産生ハイブリドーマは、例えば、未変性及び／又は変性の α s1カゼインを用いてBALB/cマウスを免疫し、免疫されたマウスの抗体産生細胞とマウスミエローマ細胞とを、常法により細胞融合させ、免疫蛍光染色パターンによりスクリーニングすることにより、抗 α s1カゼインMAb産生ハイブリドーマを作出することができる。上記の抗体産生細胞としては、例えば未変性及び／若しくは変性の α s1カゼイン又はこれを含有する組成物を投与して免疫した動物から得られる脾臓細胞、リンパ節細胞、B-リンパ球等を挙げることができる。免疫する動物としてはマウス、ラット、ウサギ、ウマ等が挙げられる。免疫は、例えば未変性及び／又は変性の α s1カゼインをそのまま又は適当なアジュバントと共に動物の皮下、筋肉内又は腹腔内に1～2回/月、1～6ヶ月間投与することにより行なわれる。抗体産生細胞の分離は、最終免疫から2～4日後に免疫動物から採取することにより行なわれる。ミエローマ細胞としては、マウス、ラット由来のもの等を使用することができる。抗体産生細胞とミエローマ細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0017】

細胞融合は、例えばダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)等の培地中で抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコール等の融合促進剤の存在下で混合することにより行なうことができる。細胞融合終了後、DMEM等で適当に希釈し、遠心分離し、沈殿をHAT培地等の選択培地に懸濁して培養することによりハイブリドーマを選択し、次いで、培養上清を用いて酵素抗体法により抗体産生ハイブリドーマを検索し、限界希釈

法等によりクローニングを行ない、抗 α s1カゼインMAbを産生するハイブリドーマを得ることができる。また、未変性の α s1カゼインのみを用いて免疫した抗免疫動物から、有利に抗変性 α s1カゼインMAbを得ることができる。この場合、抗変性 α s1カゼインMAb産生ハイブリドーマをスクリーニングしてもよいし、あるいは、固相状態でのELISAで未変性の α s1カゼインに対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択し、この抗体産生ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体から液相状態で未変性の α s1カゼインに対してのみ特異的に反応する抗 α s1カゼインMAbを得ることができる。前記のように、抗体産生ハイブリドーマを培地中又は生体内で培養しモノクローナル抗体を培養物から採取することができるが、培養物又は腹水からのモノクローナル抗体の分離・精製方法としては、タンパク質の精製に一般的に用いられる方法であればどのような方法でもよく、例えば、IgG精製に通常使用される硫酸分画法、陰イオン交換体又はプロテインA、G等のカラムによるクロマトグラフィーによって行なうことができる。

【0018】

また、標識化抗体作製に用いられる標識物質としては、単独でまたは他の物質と反応することにより検出可能なシグナルをもたすことができる標識物質であればよく、酵素、蛍光物質、化学発光物質、放射性物質、金コロイド等を使用するのができ、酵素としてはペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等を、蛍光物質としては、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等を、発光物質としては、ルミノール類、ジオキセタン類、アクリジニウム塩類等を、放射性物質としては ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 若しくは ^{131}I 等を例示することができる。標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤、蛍光剤、発光剤等が用いることができる。

【0019】

本発明の乳アレルゲン検出用キットには、有効成分としての抗 α s1カゼインMAb、好ましくはそれぞれ異なるエピトープを認識する2以上の抗 α s1カゼインMAbを含むが、これらは保存安定性の点から、溶液状態よりも凍結乾燥物として収容されていることが好ましく、検出用キットにはかかる抗 α s1カゼインMAb溶解する緩衝液や培養液の他、試料を調製するための緩衝液等を含んでいてもよい。また、より好ましい別の態様の本発明の乳アレルゲン検出用キットとしては、前記イムノクロマト法における試験ストリップを挙げることができる。この場合、異なるエピトープを認識する2種類のモノクローナル抗体の少なくとも一つを、イムノクロマト用に用いられる金コロイドで標識されたモノクローナル抗体とすることが好ましい。

【0020】

本発明のモノクローナル抗体としては、抗 α s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN1や抗 α s1カゼインモノクローナル抗体Pas1CN2を挙げることができ、モノクローナル抗体Pas1CN1産生ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体Pas1CN2産生ハイブリドーマは、2004年9月7日にそれぞれ受領番号FERM 20206及びFERM AP-20207として、独立行政法人産業技術総合研究所 特許性物寄託センターに受託されている。

【0021】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0022】

[抗 α s1カゼインモノクローナル抗体の確立]

1. 材料及び方法

1) α s 1 カゼイン (以下「 α CN」という) の調製

新鮮な牛乳より Zittle (1959) に従い、 α CN の粗画分を得た。この粗画分をさらに TSK gel DEAE 650S (TOSOH) を用いて、50 mM のイミダゾール-HCl 緩衝液 (pH 6.4)、4 M の尿素を含む NaCl のリニアグラジエント (0 から 0.3 M) により精製を行った。精製した α CN 画分を蒸留水による透析後、凍結乾燥を行った。生理食塩水でこの凍結乾燥物の 0.1% 溶液を調製し、1 ml 容エッペンドルフチューブに 500 μ l ずつ分注し、免疫に供するまで -20°C で凍結保管し、抗原溶液とした。

【0023】

2) 免疫

供試動物として、6 週齢の BALB/c マウス (日本クレア株式会社製) 5 尾を用いた。初回免疫には、完全フロイントアジュバント (Difco) を 0.1% の α CN が 500 μ l 入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを 1 尾当たり 150 μ l 腹腔内に注射した。また、追加免疫は、3 週間の間隔で 2 回行った。免疫には、不完全フロイントアジュバント (Difco) を 0.1% の α CN が 500 μ l 入ったエッペンドルフチューブに等量加え、ボルテックスミキサーにて攪拌して作製したエマルジョンを供試した。このエマルジョンを 1 尾当たり 150 μ l 腹腔内に注射した。

【0024】

3) 血中抗体価の測定

初回あるいは追加免疫で α CN を注射した 1 週間後に、各 BALB/c マウスの尾部静脈より採血を行った。採血した血液は室温に 2 時間放置後、遠心分離を行い、血清を得た。これらの血清の 10 倍希釈段を作製し、非競合法 ELISA によりマウス血中の抗 α CN 抗体価を調べた。なお、二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG (H+L) 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. 製) を用いた。

【0025】

4) ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマの作製は、ケラーとミルシュタインの方法 (1975) に従った。すなわち、十分に抗体価が上がったマウスに、0.1% α CN 溶液 100 μ l を尾部静脈より注射した。静脈注射から 4 日後、マウスより脾臓を無菌的に摘出した。脾臓を細切後、RPMI 1640 で洗浄して、滅菌ナイロンメッシュ (Cell Strainer, 70 μ m, Becton Dickinson) を通し、脾臓細胞懸濁液を得た。1,000 rpm \times 10 分の遠心分離により脾臓細胞を集め、再度 RPMI 1640 で再懸濁し細胞数をカウントした。この脾臓細胞懸濁液とマウスミエローマ細胞 (P3X63Ag8.653) 懸濁液を細胞数が 10:1 になるように混合し、再度 1,000 rpm \times 10 分の遠心分離を行い、ペレットを得た。このペレットに平均分子量 3,350 の 45% ポリエチレングリコールを滴下し細胞融合を行った。細胞溶液に RPMI 1640 を加え希釈後、遠心分離でペレットにした。このペレットに、ハイブリドーマ用培地 (10% 牛胎児血清、40 μ M の 2-メルカプトエタノール、100 U/ml のペニシリン、100 μ g/ml のストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地) に 100 μ M のヒポキサンチン、0.4 μ M のアミノプテリン、16 μ M のチミジンを含む HAT 選択培地を加え、 5×10^6 cells/well となるように 24 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に分注し、5% CO₂ 下 37°C で培養した。

【0026】

5) 限界希釈法によるクローニング

細胞培養用プレートの各ウェルの培養上清について、ELISA の一次抗体として供試し、抗 α CN 抗体を産生しているハイブリドーマの存在を調べた。ELISA により α CN に対して陽性を示したウェルのハイブリドーマについて、0.9 cell/well となるように 96 ウェルの細胞培養用プレート (Becton Dickinson) に移し、限界希釈法によるクローニングを行った。なお、フィーダー細胞として、4 週齢 BALB/c マウス胸腺細胞を 5×10^6 cells/well となるように 96 ウェル細胞培養用プレートの各ウェルに加えた。

クローニングされたハイブリドーマの培養には、10%牛胎児血清、40 mMの2-メルカプトエタノール、100 U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシンを含むRPMI 1640培地を用いた。

【0027】

6) 抗体のスクリーニング

モノクローナル抗体のスクリーニングは、未変性 α CN（以下「N- α CN」という）、尿素処理 α CN（以下「D- α CN」という）、市販のカゼインナトリウムの未変性物（以下「N-CN」という）又は市販のカゼインナトリウムの尿素処理物（以下「D-CN」という）の4種類のたんぱく質に対する反応性の違いを調べることで特異性の異なるクローンを得ることとした。D- α CNは、精製 α CNを1 mg量り、5% EDTA 100 μ l、6.0 gの尿素、0.2 mlの2-メルカプトエタノール、50 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.6）1 ml、1.5 mlの蒸留水を加え、アルミフویلで蓋をした後、100℃で1時間オイルバスで加熱、変性処理を行った。培養上清のN- α CN、D- α CN、N-CNあるいはD-CNに対する反応性を非競合法ELISAにて調べた。

【0028】

7) 腹水の採取及びMAbの精製

Jonesら（1990）に従い、まず、BALB/cマウスに不完全フロイントアジュバントを0.2 ml腹腔内に注射した。1週間後、一尾当たり 5×10^6 cellsのクローニングされたハイブリドーマを接種した。腹水貯留後、シリンジにより腹水を採取した。採種した腹水をProtein G カラム（アマシャム ファルマシア）により精製した。

【0029】

8) MAbのクラス、サブクラス及びタイプ

MAbのクラス及びサブクラスについては、Monoclonal mouse immuno α CNobulin isotyping kit (Pharmingen) により、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、IgL (κ) 及びIgL (γ) を決定した。

【0030】

9) MAbのビオチン化

精製したMAbについて、サンドイッチELISAに供試するため、それぞれビオチン化処理を行った。50 mMの炭酸緩衝液（pH 8.5）を用いて20 mg/mlとなるよう調製し、DMSOに3 mg/100 μ lで溶解したNHS-ビオチン溶液を10 μ l加え、攪拌後、氷冷しながら2時間静置した。その後、20 mg/mlとなるようにPBSで置換した。

【0031】

2. 結果

1) MAbの選択

乳の主要アレルゲンである α s1カゼイン（ α CN）を特異的に認識する6種類のMAbが得られた。これら6種類のMAbにおける、それぞれ固相とした各抗原N- α CN、D- α CN、N-CN、又はD-CNに対する特異性をダイレクトELISAにより調べた。また、これらMAbのクラス、サブクラスについても調べた。結果を表1に示す。表1中、+は各固相抗原に対し陽性であることを、-は陰性であることを示す。表1に示されるように、全ての状態の抗原に結合するMAbであるPas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3を選択した。

【0032】

【表1】

MAb名	N- α CN	D- α CN	N-CN	D-CN	クラス、サブクラス およびタイプ
Pas1CN1	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN2	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN3	+	+	+	+	IgG1 (κ)
Pas1CN4	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN5	+	-	+	-	IgG1 (κ)
Pas1CN6	+	-	+	-	IgG1 (κ)

【0033】

2) サンドイッチELISAにおける組合せ条件

ダイレクトELISAで選択したPas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3を用いて、全てのMAbの組合わせについてサンドイッチELISAを行った。Pas1CN1、Pas1CN2、Pas1CN3をそれぞれ固相あるいはビオチン化抗体として、 α CNあるいはCNを検出するためのMAbの組合せを、サンドイッチELISAにより選出した。その結果、N- α CN、D- α CN、N-CN、D-CNを検出できる組合せとしてPas1CN1 (FERM AP-20206) とPas1CN2 (FERM AP-20207) を選択した。結果を図1に示す。

【実施例2】

【0034】

[Pas1CN1とPas1CN2の認識するエピトープ]

α s1カゼイン溶液を、リシルエンドプロテアーゼで分解し、分解物をトリシンSDS-PAGE (分離ゲル16.5%、濃縮ゲル5%) により分離した。分離したゲルを用いて、エレクトロブロッティングによりPVDF膜に転写した。転写したPVDF膜にPas1CN1とPas1CN2の培養上清 (1/1000) を反応させたのち、発色させて、認識するエピトープを確認した。結果を図2に示す。その結果、認識部位はPas1CN1とPas1CN2ともに、分子量約7000、配列番号1で示される α s1カゼインのアミノ酸配列の132番目から193番目までの領域を認識した。

【実施例3】

【0035】

[サンドイッチELISAによる食品中の変性および未変性カゼインの検出]

実施例1で選択されたPas1CN1とPas1CN2の組合せにより、実際の食品中のカゼインを検出できるかを試みた。

【0036】

・ 材料及び方法

1) モデル食肉製品の作製

定量試験のためのモデル食品として食肉製品を選択し、表2に示す配合にて各濃度のカゼインナトリウムを含むモデル食肉製品を作製した。豚赤肉は、豚ロース肉より脂、スジを除去し、5mmで挽肉にしたものを使用した。

【0037】

【表 2】

モデル食肉製品の配合表

原材料	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
豚赤肉 (%)	83.0	83.0	83.0	83.0
NaCl (%)	2.0	2.0	2.0	2.0
ポリリン酸Na (%)	0.2	0.2	0.2	0.2
亜硝酸ナトリウム (ppm)	120	120	120	120
アスコルビン酸ナトリウム (ppm)	300	300	300	300
水	14.5	14.5	14.5	14.5
カゼインナトリウム (ppm)	200	20	2	0
合計 (%)	99.762	99.744	99.7422	99.742

【0038】

各配合に従い添加物を計量し、フードプロセッサーにて混合後、塩ビチューブに充填を行い、75℃で30分の加熱を行った。

【0039】

2) サンドイッチELISAによる定量分析

各モデル食肉製品を、フードプロセッサーにて均一になるまで磨砕し、分析用サンプルとした。サンプルを2gを量り取り、1M尿素および0.1% 2-メルカプトエタノールを含むPBSTを38g加え100℃、一時間加熱処理を行った。冷却後、3,000rpm×20分の遠心分離を行い、上清0.5mlにPBSTを9.5ml加え、ELISA用サンプルとした。検量線には同様に尿素・2-メルカプトエタノール処理を行ったカゼインナトリウムの段階希釈を用いた。また、分析用サンプルからPBSTを用いて抽出し、PBST (PBSにポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート0.5%加えたもの) に溶解したカゼインナトリウムを検量線とした尿素および2-メルカプトエタノールを用いない場合との比較を行った。

【0040】

・ 結果

サンドイッチELISAによるモデル食肉製品中のカゼインナトリウムの分析について、尿素および2-メルカプトエタノールを用いた結果を表3に、また、PBSTのみで抽出した結果を表4に示す。

【0041】

【表 3】

	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	235.4	16.4	1.5	N. D. *2
回収率 (%)*1	117.7	82.0	75.0	—

*1: (分析値/添加量) × 100

*2: 検出せず

【0042】

【表 4】

	TEST 1	TEST 2	TEST 3	Control
添加量 (ppm)	200.0	20.0	2.0	0.0
分析値 (ppm)	16.1	1.7	N. D. *2	N. D.
回収率 (%) *1	8.1	8.5	—	—

*1: (分析値/添加量) × 100

*2: 検出せず

【0043】

以上の結果から、尿素および2-メルカプトエタノールを抽出液に加えた場合に、高い回収率でモデル食肉製品中のカゼインナトリウムを検出可能であり、PBST抽出では非常に低い回収率となった。これらのことから、食品中からのカゼインナトリウムの抽出には尿素および2-メルカプトエタノールを用いることが有効であり、その場合に利用するMAbの特性には、尿素可溶化カゼインに結合可能であることが必要であることが明らかとなった。

【実施例 4】

【0044】

[イムノクロマトによる変性および未変性カゼインナトリウムの検出]

1. 材料および方法

1) 金コロイド標識およびコンジュゲートパッドの作製

2 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) で 1 mg/ml となるように Pas1CN1 の MAb 溶液を調製した。あらかじめ 0.2 M 炭酸カリウム溶液で pH 9.0 に調製した金コロイド溶液 (シグマ社製) 5 ml に MAb 溶液を 500 μ l 加え、室温で 30 分間反応した後、10% BSA 溶液を 625 μ l を加え、さらに 15 分間反応させた。遠心分離を行い、1% BSA 溶液で OD 525 = 1.0 になるよう調製した。ガラスウール製コンジュゲートパッドに 68 μ l/cm² となるよう塗布し、乾燥させた。

【0045】

2) 抗体固定化メンブレンの作製

PBS で 4 mg/ml となるよう Pas1CN2 の MAb 溶液を調製し、ニトロセルロースメンブレンに直線状に塗布し乾燥させた。その後、1% BSA、0.1% Tween 20 を含む PBS で 37℃、2 時間ブロッキング後、PBS で洗浄し乾燥させた。

【0046】

3) イムノクロマトストリップの組立と評価

上記で作製したサンプルパッド、コンジュゲートパッド、抗体固定化メンブレン、吸収パッドをそれぞれ貼り付け、イムノクロマトストリップとした。非検液としては、実施例 3 で調製したモデル食肉製品を適宜希釈して用いた。

【0047】

2. 結果

Pas1CN2 および金コロイド標識 Pas1CN1 の組合せによりカゼインナトリウムは加熱、非加熱に係わらず 50 ppb (食品中 2 ppm) まで検出することができた。この結果から、製造工程中に混入した未変性カゼインナトリウムが対象となっても、加熱後の製品が対象となっても、いかなる場合にでも対応できるイムノクロマトストリップの設計が可能となった。

市販のアレルゲン検出用イムノクロマトストリップでは、ブランクとして 0.01 M の尿素のみを含む PBS を滴下したところ、非特異的なバンドが生じてしまい、擬陽性となってしまう。これでは、加熱などにより変性した食品たんぱく中から効率よくアレルゲンを抽出するためのたんぱく質変性剤を使用できず、アレルゲンとして検出できる対象が

極めて狭い範囲に限られてしまう危険性が考えられた。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

【図 1】 本発明の 2 種類の抗 α s 1 カゼイン M A b を用いた、各種状態の α s 1 カゼインに対するサンドイッチ E L I S A の結果を示す図である。

【図 2】 本発明の P a s 1 C N 1 および P a s 1 C N 2 の認識する小麦 α s 1 カゼインの構成たんぱく質の相違を示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Prima Meat Packers, Ltd.

<120> Method for detecting milk allergen

<130> 2004P2325

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 199

<212> PRT

<213> cow

<400> 1

Arg	Pro	Lys	His	Pro	Ile	Lys	His	Gln	Gly	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Leu
1				5					10					15	

Asn	Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Phe	Phe	Val	Ala	Pro	Phe	Pro	Gln	Val	Phe
			20					25					30		

Gly	Lys	Glu	Leu	Val	Asn	Glu	Leu	Ser	Lys	Asp	Ile	Gly	Ser	Glu	Ser
		35					40					45			

Thr	Glu	Asp	Gln	Ala	Met	Glu	Asp	Ile	Lys	Gln	Met	Glu	Ala	Glu	Ser
	50						55				60				

Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Pro	Asn	Ser	Val	Gln	Gln	Lys	His
65					70					75				80	

Ile	Gln	Lys	Glu	Asp	Val	Pro	Ser	Glu	Arg	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Leu	Glu
				85					90					95	

Gln	Leu	Leu	Arg	Leu	Lys	Lys	Tyr	Lys	Val	Pro	Gln	Leu	Glu	Ile	Val
			100					105					110		

Pro	Asn	Ser	Ala	Glu	Glu	Arg	Leu	His	Ser	Met	Lys	Glu	Gly	Ile	His
			115				120					125			

Ala Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr
130 135 140

Phe Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Thr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro
145 150 155 160

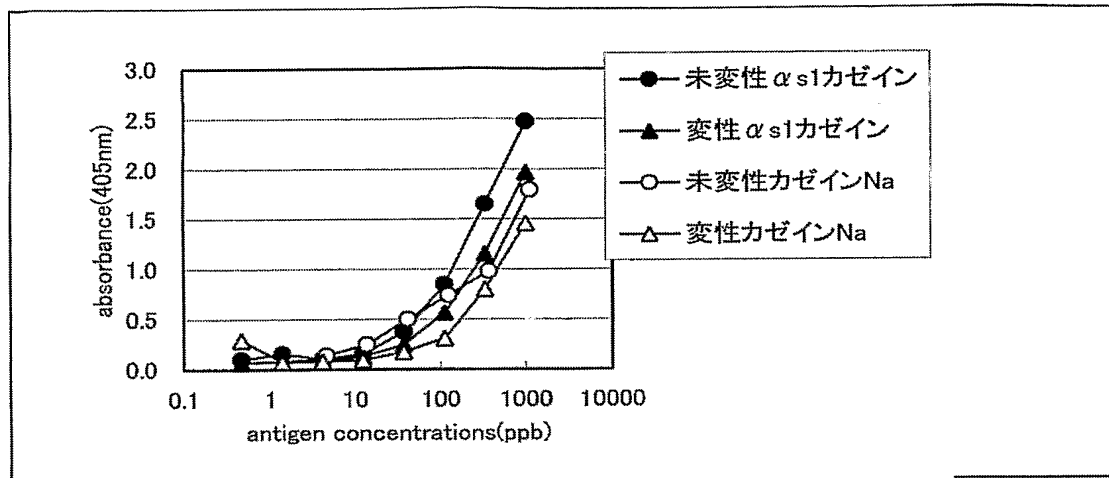
Ser Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala
165 170 175

Pro Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu
180 185 190

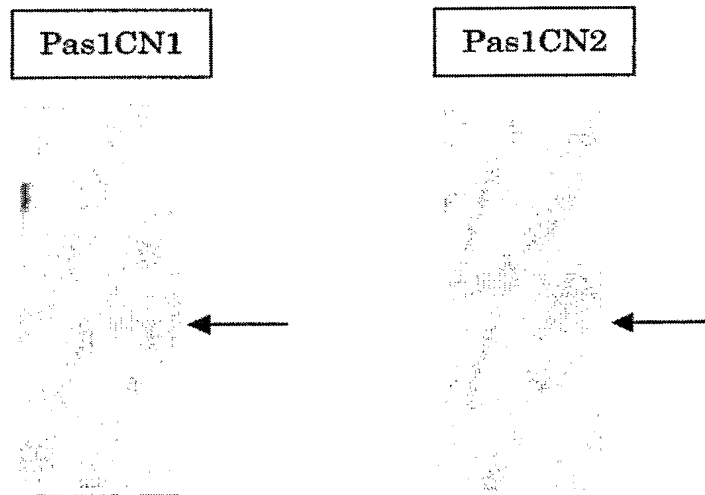
Lys Thr Thr Met Pro Leu Trp
195

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 乳アレルギーを含む食品において、乳アレルギーが変性／未変性のいかなる状態にあっても検出できる高感度な免疫学的な検出方法及びそれに用いられる検出キット等を提供すること。

【解決手段】 抗 α s1カゼインモノクローナル抗体が、未変性 α s1カゼイン、尿素処理 α s1カゼイン、未変性カゼインナトリウム、及び変性カゼインナトリウムを認識し、かつ異なるエピトープを認識する2種類の抗 α s1カゼインモノクローナル抗体を併用して、乳アレルギーを検出する。食肉製品等の検体からのカゼインの抽出には、尿素と2-メルカプトエタノールとが有利に用いられる。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 2
受付番号	5 0 4 0 1 6 6 0 9 2 5
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0 0 9 0
作成日	平成 1 6 年 9 月 3 0 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	000113067
【住所又は居所】	東京都品川区東大井 3 丁目 1 7 番 4 号
【氏名又は名称】	プリマハム株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100107984
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	廣田 雅紀

【選任した代理人】

【識別番号】	100102255
【住所又は居所】	東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	小澤 誠次

【選任した代理人】

【識別番号】	100123168
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	大▲高▼ とし子

【選任した代理人】

【識別番号】	100120086
【住所又は居所】	東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 廣田特許事務所
【氏名又は名称】	▲高▼津 一也

特願 2 0 0 4 - 2 8 5 5 4 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 1 3 0 6 7]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 5 月 1 6 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都品川区東大井 3 丁目 1 7 番 4 号
氏 名	プリマハム株式会社